

氏名	こはま きよこ 小濱 清子
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第76号
学位授与の日付	平成30年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	リポ多糖 (LPS) によってマクロファージに短時間で誘導される細胞障害に関する研究～p38 MAPK の持続的なリン酸化と MAP kinase phosphatase-1(MKP-1)の関与～
論文審査委員	(主査) 教授 福永 理己郎 (副査) 教授 天野 富美夫 (副査) 教授 藤森 功

論文内容の要旨

マクロファージは生体内で様々な機能を有する免疫担当細胞の一つで、その機能の多くは種々の生理活性物質の調節を受ける。グラム陰性菌の主要な外膜成分であるリポ多糖 (LPS) もその一つであり、非常に微量で臓器障害や敗血症ショックを起こす。LPS がマクロファージの細胞表面にある CD14 を介して Toll-like receptor 4 (TLR4) に結合し、細胞内にシグナルが伝達されると、マクロファージは活性化され、活性酸素、一酸化窒素 (NO)、プロスタグランジン (PGx)、interleukin-1 β (IL-1 β) や tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインを産生し、その結果、周辺組織に対し、あるいは全身性に細胞障害を引き起こす。この細胞障害は、活性酸素や炎症性サイトカインの過剰産生により、マクロファージ自身に及ぶこともある。

一方、上記の様な活性化を介さずに、LPS がマクロファージに対して直接及ぼす細胞障害については、不明な点が多い。一例として、グラム陰性菌のサルモネラの感染によってマクロファージはアポトーシスを起こすが、これはマクロファージの活性化を伴わずに急速に起こる。この細胞障害は、LPS 単独で誘導される細胞障害よりも短時間で誘導され、その際、炎症性サイトカインの過剰産生は見られない。すなわち、LPS の作用と、感染によって起こる宿主側の何らかの変化が重なって起こる細胞障害であると推察される。

In vitro においては、マウスマクロファージ系細胞株 J774.1/JA-4 細胞は、LPS を添加すると活性化され、TNF- α などの炎症性サイトカインや NO や PGx などの炎症メディエーターを産生する。一方、我々の研究室では、LPS 存在下で J774.1/JA-4 細胞にタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) や anisomycin を加えると、細胞は活性化されず、アポトーシスが急速に誘導され、続いてネクローシスへと移行することを発見した。この細胞障害の特徴は、LPS あるいは CHX の単独添加では細胞障害が起きない条件下で、両者が共存して初めて起こる点である。本研究では、この細胞障害の誘導機構の解析を行い、CHX や anisomycin の影響を受けるタンパク質が MAP kinase phosphatase-1(MKP-1)である可能性を見出した。その概要を以下に述べる。

まず、LPS シグナルの伝達経路として最も重要なものの一つである MAPK 経路に注目した。ウェスタンブロットティングおよび、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM) による画像解析の結果、MAPK の中でも p38MAPK に特徴的な変化が確認された。通常、LPS 添加後 15~30 分間で p38MAPK はリン酸化を受けて p-p38MAPK となって核内に移行するが、その後脱リン酸化されて p38MAPK となり、核内から細胞質に局在が変わる。しかし、LPS とともに CHX を添加すると、p38MAPK は 60 分後においても p-p38MAPK としてリン酸化された状態を持続しながら核内に局在した。そこで、LPS と CHX による細胞障害の誘導には、p-p38MAPK の脱リン酸化過程の異常が関与しているのではないかと考え、CHX や anisomycin の作用について p-p38 MAPK の脱リン酸化酵素の生合成の阻害に焦点を当てて検討した。特に、LSM による画像解析から、p38 MAPK がリン酸化されたまま持続して核内にとどまっていたことから、解析の対象とすべき脱リン酸化酵素は核内に存在するものだと考えた。また、LPS 添加から CHX を加えるまでの時間を変化させて影響を調べた結果、LPS 添加から CHX を加えるまでの時間が 30 分までは同時添加と同様の細胞障害を示したのに対し、45 分以降の添加では細胞障害の割合が減少し始め、60 分後の添加ではバックグラウンドレベルにまで低下した。これは、関与する脱リン酸化酵素が LPS 刺激によって 60 分以内に誘導されて生合成される、非常に代謝回転の速い酵素であること、そしてその生合成の阻害が p-p38 MAPK の蓄積を引き起こすことを示唆する。

以上の結果から、数ある脱リン酸化酵素の中から p-p38 MAPK の脱リン酸化酵素である PP2A と MKP-1 を候補として選択した。その結果、PP2A の阻害剤である endothall は、単独あるいは LPS との併用のいずれにおいても細胞障害性の誘導に影響を示さず、また、protein phosphatase 2A(PP2A)は LPS と CHX 処理細胞において著しい発現量の低下を示さなかった。これに対して、MKP-1 の発現を抑制することが知られている triptolide は、LPS との併用時に有意な細胞障害を誘導した。また、p38 MAPK についても核内で持続的にリン酸化していることが確認された。さらに、MKP-1 は、LPS 処理細胞に CHX あるいは triptolide

を併用した場合のいずれにおいても、発現が著しく低下して検出されなくなった。これらの結果から、CHX や anisomycin の影響を受ける脱リン酸化酵素は PP2A ではなく MKP-1 である可能性が示唆された。

次に、triptolide の LPS 処理マクロファージへの経時的な影響を調べた。Triptolide は LPS 添加より前の添加で細胞障害を示したが、同時添加以降は時間経過に伴って細胞障害の割合が低下し、60 分以降では検出されなくなった。一方、LPS によって MKP-1 の遺伝子発現は非常に速やかに誘導されたが、その mRNA は培養時間の経過に伴って速やかに分解されて減少した。

また、この短時間で誘導される細胞障害について、LPS の細胞表面への結合とそれに続くシグナル伝達経路が重要であることを、LPS 耐性変異株 LPS1916 細胞、および LPS と CHX で誘導される細胞死に対して抵抗性を示す変異株 LCR1-1 細胞と LCR1-3 細胞、更には LPS 低応答性マウス C3H/HeJ の腹腔マクロファージを用いて示した。LPS1916 細胞および LCR 細胞は、CD14 の細胞表面への局在性に異常があり、C3H/HeJ マウス由来腹腔マクロファージは TLR4 に変異があることが分かっている。これらの変異株、LPS 低応答性の細胞においては、親株で確認された LPS と CHX および LPS と triptolide の併用による細胞障害が抑制された。この結果から、この細胞障害は TLR4 と CD14 の両方を介して誘導されることが示唆された。

これらの結果から、マクロファージにおいては、LPS の刺激から MKP-1 の発現に至る非常に短い時間の内に、マクロファージの活性化とアポトーシスの誘導の分岐点が存在し、MKP-1 の発現がこの分岐点の制御に関与している可能性が示唆された。

本研究では、LPS によって引き起こされる細胞障害の中でも、種々の炎症性サイトカインの産生誘導を伴わない、短時間で誘導される新たな LPS の細胞障害機構の解明を目的とし、特にシグナル伝達に焦点を当てて実験を行った。その結果、p38MAPK の持続的リン酸化と脱リン酸化酵素 MKP-1 の関与を示唆する結果を得た。マクロファージの免疫応答に関わるシグナル伝達機構については依然として不明な点が多いが、それらの解明によって、免疫応答の異常を伴う疾患に対してシグナル伝達の面から治療法の開発が期待できる。本研究の成果は、そのシグナル伝達機構の全体像の解明のために、また、炎症のみならず、アポトーシスの誘導および抑制に関わる多くの疾患の病態の解明と治療への応用に貢献できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

マクロファージは生体内で様々な機能を有する免疫担当細胞の一つで、その機能の多くは種々の生理活性物質の調節を受ける。グラム陰性菌の主要な外膜成分であるリポ多糖 (LPS) もその一つであり、非常に微量で臓器障害や敗血症ショックを起こす。LPS がマクロファージの細胞表面にある CD14 を介して Toll-like receptor 4 (TLR4) に結合し、細胞内にシグナルが伝達されるとマクロファージは活性化され、活性酸素、一酸化窒素 (NO)、プロスタグランジン (PGx)、interleukin-1 β (IL-1 β) や tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインを産生し、その結果、周辺組織に対し、あるいは全身性に細胞障害を引き起こす。

一方、LPS が上記の様な活性化を介さずに直接マクロファージに及ぼす細胞障害については、不明な点が多い。一例として、グラム陰性菌のサルモネラの感染によって引き起こされるマクロファージのアポトーシスは、活性化の過程を伴わずに急速に引き起こされるが、この細胞障害は、LPS の作用に加えて、感染によって生じる宿主側の応答が重なった結果であると考えられる。小濱清子君が修士課程で所属した研究室では、マウスマクロファージ系細胞株 J774.1/JA-4 細胞を LPS で刺激する際にタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) や anisomycin を加えると、細胞の活性化を経ずに急速なアポトーシスが誘導されることを見出した。

以上の背景のもと、小濱清子君は、LPS や CHX の単独添加では生じないマクロファージの細胞障害が両者の共存によって初めて引き起こされる点に着目し、LPS 刺激に強く応答する MAP kinase である p38 MAPK の活性化動態および細胞内局在変化を詳細に解析すると共に、CHX や anisomycin、さらに triptolide が及ぼす影響について研究を行った。

まず、共焦点レーザー顕微鏡による画像解析およびウェスタンブロッティングによって、p38 MAPK の活性化動態を解析した。その結果、LPS の単独添加においては 15～30 分間をピークとして p38 MAPK のリン酸化および核内移行が引き起こされた後に急速な脱リン酸化と細胞質への局在変化が観察されるのに対し、LPS と共に CHX を添加すると、60 分後においても p38 MAPK のリン酸化状態と核内への局在が維持されることを見出した。また、LPS 添加後に CHX を加えた場合の影響を調べた結果、LPS 添加 30 分後までの CHX は同時添加と同様の細胞障害を示すのに対し、45 分以降の添加では細胞障害の程度が減弱することが明らかになった。これらの結果は、LPS と CHX による細胞障害の誘導にはリン酸化された p38 MAPK の脱リン酸化過程の異常が関与している可能性を示唆すると共に、これに関与する脱リン酸化酵素の誘導的発現とその活性消失の代謝回転が非常に速いことを示

唆する。

そこで次に、p38 MAPK の脱リン酸化に関与することが知られている protein phosphatase 2A (PP2A) と MKP-1 について検討を行った。その結果、PP2A の阻害剤である endothall は CHX 存在下 LPS 刺激による細胞障害誘導に影響を示さず、また、LPS と CHX 刺激による細胞障害において PP2A の発現量低下は認められなかった。一方、MKP-1 の発現を抑制することが知られている triptolide を LPS と併用すると有意な細胞障害が誘導され、その際に p38 MAPK の持続的リン酸化と核内への局在が維持されていることが明らかになった。さらに、CHX あるいは triptolide と LPS で併用処理した細胞のいずれにおいても、MKP-1 の発現が著しく阻害されることも示された。これらの結果は、CHX、anisomycin、および triptolide の影響を受ける脱リン酸化酵素は PP2A ではなく MKP-1 であることを示している。

一方、J774. 1/JA-4 細胞に由来する LPS 耐性変異株 LPS1916 細胞、および LPS/CHX 誘導性細胞障害に抵抗性を示す変異株 LCR 細胞、さらに LPS に低応答性であることが知られている C3H/HeJ マウスの腹腔マクロファージを用いて、各種阻害剤と LPS の併用刺激が誘導する細胞障害における細胞内シグナル伝達経路を解析した。その結果、CD14 の細胞表面への局在に異常を有する LPS1916 細胞および LCR 細胞、および TLR4 に変異を有する C3H/HeJ マウス由来腹腔マクロファージのいずれにおいても、LPS と CHX、あるいは LPS と triptolide の併用による細胞障害が抑制されたことから、この細胞障害は TLR4 と CD14 の両方を介して誘導されることが示された。以上の結果は、LPS の刺激から MKP-1 の発現に至る非常に短い時間の内にマクロファージの活性化とアポトーシスの誘導の分岐点が存在し、MKP-1 の発現がこの分岐点を制御することを示唆する。

小濱清子君は、本研究により、マクロファージが LPS 刺激を受ける際にタンパク質合成阻害などの要因が加わることによって速やかに誘導される細胞障害のシグナル伝達機構について解析し、MKP-1 の発現阻害に起因する p38 MAPK の持続的リン酸化が細胞障害を引き起こす可能性を示すと共に、その細胞障害には TLR4 と CD14 の両方のシグナル伝達経路が関与することを明らかにした。本研究の成果は、マクロファージが関与する免疫システムにおける異常応答のシグナル伝達機構を解明するための重要な知見を提供し、炎症関連疾患の病態解明とその治療法の開発に貢献することが期待される。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。